



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類6</b> C12N 15/31, C12P 21/02, C12N 1/21 // (C12N 15/31, C12R 1:15) (C12N 1/21, C12R 1:15)	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO00/14241</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 2000年3月16日(16.03.00)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP98/03981 <b>(22) 国際出願日</b> 1998年9月4日(04.09.98)  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 永井和夫(NAGAI, Kazuo)[JP/JP] 〒171-0014 東京都豊島区池袋3-42-17 Tokyo, (JP) 和地正明(WATI, Masaaki)[JP/JP] 〒194-0002 東京都町田市南つくし野1-4-1 Tokyo, (JP)		<b>(81) 指定国</b> AU, BG, BR, BY, CN, CZ, HU, IL, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  <b>添付公開書類</b> 国際調査報告書 明細書とは別に規則 1 3 の 2 に基づいて提出された生物材料 の寄託に関する表示。 不利にならない開示又は発明の新規性の喪失の例外に関する 陳述。
<b>(54)Title: NOVEL GENE</b>  <b>(54)発明の名称</b> 新規遺伝子  <b>(57) Abstract</b> A protein having the activity of imparting a nonsensitivity to lysozyme to a lysozyme-sensitive microorganism belonging to <i>Corynebacterium glutamicum</i> ; a DNA encoding this protein; a recombinant vector containing this DNA; a transformant obtained by transferring this recombinant vector to a host cell; a bacterium having a sensitivity to lysozyme in which the activity of the above protein has been inactivated; and a process for producing an amino acid by using this bacterium.		

# (57)要約

コリネバクテリウム・グルタミクムに属するリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該DNAを含有する組換えベクター、該組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体、該蛋白質が有する活性を不活性化させたリゾチーム感受性を有する細菌、および該細菌を用いるアミノ酸の製造方法に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BJ	ベナン	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BR	ブラジル	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BS	バハマ	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BT	ブータン	HR	クロアチア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
CC	中東アフリカ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CF	コンゴ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IN	インド	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IS	アイスランド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IT	イタリア	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KR	韓国	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

## 明 細 書

### 新規遺伝子

#### 技術分野

本発明は、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) に属するリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子に関する。該遺伝子を不活性化して得られるリゾチーム感受性を有する細菌はアミノ酸の製造等に有用である。

#### 背景技術

コリネバクテリウム属に属するリゾチーム感受性変異株は、グルタミン酸の製造（特公平1-29555）およびグルタミンの製造（特公昭62-49038）に用いられ、また形質転換体を作製するための宿主（特開昭58-56678）として用いられている。

従来、コリネバクテリウム属に属し、かつリゾチーム感受性を有する微生物は、変異誘起剤を用いて染色体にランダムに変異を導入し、得られた株の中からリゾチーム感受性変異株を選択する方法によって取得されている（特公昭62-49038、特公平1-29555、特開昭58-56678）。しかし、この方法では、リゾチーム感受性に係わる変異だけでなく、好ましくない変異も付随して生じる可能性が高いため、計画的かつ効率的にリゾチーム感受性微生物を取得することは困難である。

#### 発明の開示

本発明は、以下の（1）～（19）に関する。

（1）配列番号2で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質、または配列番号2で示されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつコリネバクテリウム・グルタミカムに属するリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(2) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と 60% 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつコリネバクテリウム・グルタミクムに属するリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(3) 配列番号 1 で示される塩基配列からなる DNA、または配列番号 1 に示される DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつコリネバクテリウム・グルタミクムに属するリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(4) FERM BP-6479 に含有されるプラスミドに含まれ、かつコリネバクテリウム・グルタミクムに属するリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(5) コリネバクテリウム・グルタミクムに属するリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質が、コリネバクテリウム・グルタミクムに属し、かつ  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  以下のリゾチームに感受性を有する変異株に  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  のリゾチームに非感受性を付与する活性を有する蛋白質である、(1) ~ (4) のいずれかに記載の DNA。

(6) DNA がコリネバクテリウム属に属する微生物由来の DNA である (1) ~ (5) のいずれかに記載の DNA。

(7) DNA がコリネバクテリウム・グルタミクムに属する微生物由来の DNA である (1) ~ (5) のいずれかに記載の DNA。

(8) (1) ~ (7) のいずれかに記載の DNA を含有してなる組換えベクター。

(9) (8) の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

(10) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質、または配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつコリネバクテリウム・グルタミクムのリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質。

(11) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と 60% 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつコリネバクテリウム・グルタミクムのリゾチーム感受

性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質。

(12) コリネバクテリウム・グルタミクムに属するリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質が、コリネバクテリウム・グルタミクムに属し、かつ  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  以下のリゾチームに感受性を有する変異株に  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  のリゾチームに非感受性を付与する活性を有する蛋白質である、(10) または (11) に記載の蛋白質。

(13) (10) 記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に (10) ~ (12) のいずれかに記載の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする蛋白質の製造方法。

(14) (10) ~ (12) のいずれかに記載の蛋白質が有する活性を不活性化させることを特徴とする、リゾチーム感受性を有する細菌の作製方法。

(15) 染色体上に存在する (10) ~ (12) のいずれかに記載の蛋白質をコードする遺伝子に変異を導入する、(14) 記載の方法。

(16) 細菌がコリネバクテリウム属に属する微生物である、(14) または (15) 記載の方法。

(17) (14) ~ (16) のいずれかに記載の方法により得られる細菌。

(18) (17) 記載の細菌を培地に培養し、培養物中にアミノ酸を生成蓄積させ、該培養物からアミノ酸を採取することを特徴とするアミノ酸の製造方法。

(19) アミノ酸がグルタミン酸またはグルタミンである (18) 記載の方法。

本発明のDNAは、コリネバクテリウム・グルタミクムに属するリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質をコードするDNAであり、例えば以下に記載する本発明の蛋白質をコードするDNAがあげられ、具体的には配列番号1に示される塩基配列を有するDNAがあげられる。

また、本発明のDNAとしては、本発明の蛋白質をコードするDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAがあげられる。

本発明において「ストリンジントな条件下でハイブリダイズ可能なDNA」とは、例えば配列番号1で表される塩基配列を有するDNAをプローブとし

て、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0Mの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)（以下、モレキュラー・クローニング第二版と略す）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。

ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号1で表される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

本発明の蛋白質としては、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質、該蛋白質をコードするアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつコリネバクテリウム・グルタミクムに属するリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質、配列番号2で示されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつコリネバクテリウム・グルタミクムに属するリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質をあげることができる。

配列番号1で示されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ該蛋白質の有するリガンド結合

能およびDNA結合能を有する蛋白質は、以下、モレキュラー・クローニング第二版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号2で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより行うことができる。

欠失、置換または付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、1個から数十個のアミノ酸であることが好ましく、1個から数個のアミノ酸であることがさらに好ましい。また、配列番号1記載のアミノ酸配列と少なくとも60%以上、通常は80%以上、特に95%以上の相同性を有していることが好ましい。

以下、本発明を詳細に説明する。

#### (1) 染色体DNAおよび組換え体ベクターの調製

本発明のDNAは、コリネバクテリウム属に属するリゾチーム非感受性株より調製することができる。

コリネバクテリウム属に属するリゾチーム非感受性株としては、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のリゾチームが培地中に存在していても良好に生育する菌株であれば、例えばコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032株、KY9611株等、いずれの菌株を用いてもよい。

コリネバクテリウム属に属するリゾチーム非感受性株を公知の方法、例えばAppl. Microbiol. Biotechnol. 39, 318 (1993)に記載の方法に従って培養する。

培養後、公知の方法、例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Agric. Biol. Chem. 49, 2925 (1985)に従って、該微生物の染色体DNAを単離精製する。

得られた染色体DNAを適当な制限酵素で切断し、常法、例えばモレキュラー・クローニング第二版等の記載に準じて、該DNA断片をコリネバクテリウム用ベクターに挿入することにより、組換え体ベクターを作製することができる。

ベクターとしては、コリネバクテリウム属に属する微生物中で自立複製できるものであればいずれも用いることができ、pCG1（特開昭57-134500）、pCG2（特開将58-35197）、pCG4、pCG11（いずれも特開昭57-183799）、pCE53、pCB101（いずれも特開昭58-105999）、pCE51、pCE52、pCE53[いずれもMol. Gen. Genet., 196, 175 (1984)]、pAJ1844（特開昭58-21619）、pHK4（特開平7-20399）、pHM1519 [Agric. Biol. Chem., 48, 2901, (1985)]、pCV35、pECM1 [いずれもJ. Bacteriol., 172, 1663 (1990)]、pC2 [Plasmid, 36, 62 (1996)]等を例示することができる。

## (2) 本発明のDNAの調製

上記で作製した組換え体ベクターを、コリネバクテリウム・グルタミクム属するリゾチーム感受性微生物に導入する。

コリネバクテリウム・グルタミクムに属するリゾチーム感受性微生物としては、コリネバクテリウム・グルタミクムに属し、かつリゾチーム感受性を示すものであれば、野生株、変異株のいずれを用いてもよい。コリネバクテリウム・グルタミクムに属する微生物のうち、野生株は、通常 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のリゾチームが培地中に存在していてもその生育には何等影響を受けない、即ちリゾチーム非感受性であることが多い。このため、リゾチーム感受性微生物としては、変異株を通常用いる。

リゾチーム感受性微生物は、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の低濃度のリゾチームが培地中に存在すると、その生育が阻害される。

リゾチーム感受性微生物は、コリネバクテリウム・グルタミクムを親株として、公知の方法（特公昭62-49038、特公平1-29555、特開昭58-56678）に準じて分離することができる。このような変異株としては、コリネバクテリウム・グルタミクムKY9611株より分離されたコリネバクテリウム・グルタミクムATCC31834株（FERM P-5946）（特開昭58-56678）、KY9714株、KY11939株、KY11940株、KY11941株、あるいはコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032株より分離されたKY9704株、KY9706株等を例示する



ことができる。

組換え体ベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、プロトプラスト法（特開昭57-186492、特開昭58-56678、J. Bacteriol., 159, 306 (1984)）、エレクトロポレーション法（特開平2-207791）等をあげることができる。あるいは大腸菌でコリネバクテリウム属に属するリゾチーム非感受性株の染色体DNAライブラリーを作製し、これを公知の方法にしたがって、大腸菌より接合伝達によってコリネバクテリウム・グルタミクムのリゾチーム感受性微生物に導入することも可能である [J. Bacteriol. 172, 1663 (1990)、J. Bacteriol. 178, 5768 (1996)]。

組換え体ベクターを導入したコリネバクテリウム・グルタミクムのリゾチーム感受性微生物を、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のリゾチームを含有する培地、例えば $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のリゾチームを含有するLB培地 [バクトトリプトン（ディフコ社製） $10\text{g}/\text{l}$ 、酵母エキス（ディフコ社製） $5\text{g}/\text{l}$ 、塩化ナトリウム $5\text{g}/\text{l}$ （pH 7.2）] を用い、通常 $20\sim 39^{\circ}\text{C}$ で $24\sim 72$ 時間培養する。培養後、該培地で生育した菌株を、目的のDNAを有する菌株として選択する。

リゾチーム感受性微生物は、その生育が温度感受性となっている場合がある。その生育が温度感受性となっているリゾチーム感受性微生物は、リゾチームが培地中に存在しない場合でも高温域（例えば $34\sim 39^{\circ}\text{C}$ ）では生育できない。このような場合には、リゾチームを含有しない培地を用いて、リゾチーム感受性微生物が生育できない温度、例えば $34\sim 39^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $36\sim 38^{\circ}\text{C}$ で生育する菌株を、目的のDNAを有する菌株として選択することができる。

このような変異株としては、コリネバクテリウム・グルタミクムKY9611株より分離されたコリネバクテリウム・グルタミクムKY9714株、KY11941株、あるいはコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032株より分離されたKY9704株、KY9706株等を例示することができる。

取得したDNAをそのまま、あるいは適当な制限酵素などで切断後常法によ

りベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] あるいは 373A・DNA シーケンサー (パーキン・エルマー社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定する。

該DNAを組み込むベクターとしては、pBluescript KS(+) (ストラタジーン社製)、pDIRECT [Nucleic Acids Research, 18, 6069 (1990)]、pCR-Script Amp SK(+) (ストラタジーン社製)、pT7Blue (ノバジェン社製)、pCR II (インビトロジェン社製)、pCR-TRAP (ジーンハンター社製) および pNoTAT7 (5 プライム→3 プライム社製) などをあげることができる。

上記のようにして取得された新規な塩基配列を有するDNAとして、例えば、配列番号1および配列番号3で示される配列を有するDNA等をあげることができる。

配列番号1で表される塩基配列を有するDNAには、配列番号2記載のアミノ酸配列を有する蛋白質がコードされている。

配列番号1で表される配列を有するDNAを保有するプラスミドを保有する菌株としては、例えばコリネバクテリウム・グルタミカムKY9714/pHLS2、コリネバクテリウム・グルタミカムKY9714/pHLS4等をあげることができる。

また、上記により決定された塩基配列に基づいたプライマーを調製し、染色体DNAを鋳型として、PCR法 [PCR Protocols, Academic Press (1990)] により目的とするDNAを取得することができる。

更に、決定されたDNAの塩基配列に基づいて、パーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成装置等を用いて化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。

### (3) 本発明の蛋白質の製造

本発明の蛋白質は、モレキュラー・クローニング第二版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、本発明のDNAを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

全長 cDNA をもとにして、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。

該 DNA 断片、または全長 cDNA を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、本発明の蛋白質を生産する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なものは染色体中への組込が可能で、本発明の蛋白質をコードする DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、本発明の蛋白質をコードする DNA を含有してなる組換えベクターは細菌中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明の蛋白質をコードする DNA、転写終結配列、より構成されたベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（Pharmacia社）、pSE280（Invitrogen社）、pGEMEX-1（Promega社）、pQE-8（QIAGEN社）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-)（Stratagene社）、pTrs30 [Escherichia coli JM109/pTrS30 (FERM BP-5407) より調製]、pTrs32 [Escherichia coli JM109/pTrS32 (FERM BP-5408) より調製]、pGHA2 [Escherichia coli IGHA2 (FERM B-400) より調製、特開昭60-221091]、pGKA2 [Escherichia coli IGKA2 (FERM BP-6798) より調製、特開昭60-221091]、pTerm2 (US4686191、US4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX（Pharmacia社）、pETシステム（Novagen社）、pSupex等をあげることができる。

プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター ( $P_{trp}$ )、lacプロモーター、 $P_L$ プロモーター、 $P_R$ プロモーター、T7プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターをあげることができる。また $P_{trp}$ を2つ直列させたプロモーター ( $P_{trp} \times 2$ )、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列であるシャインーダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6～18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明の蛋白質をコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換することにより、目的とする蛋白質の生産率を向上させることができる。

本発明の組換えベクターにおいては、本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法

であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-2483942)、またはGene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)等をあげることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF $\alpha$ 1プロモーター、CUP1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス属、クリュイペロミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriology, 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133, (1990)]、pAS3-3 (特開平2-227075)、pcDM8 [Nature, 329, 840, (1987)]、pcDNA1/Amp (Invitrogen社)、pREP4 (Invitrogen社)、pAGE103 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、pAGE210等をあげることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299) 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにInvitrogen社) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21 [

Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHigh 5 (Invitrogen社)等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (Agrobacterium)を用いる方法 (特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977)、エレクトロポレーション法 (特開昭60-251887)、パーティクルガン (遺伝子銃)を用いる方法 (特許第2606856、特許第2517813)等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第二版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明の蛋白質を製造することができる。本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の細菌あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中のpHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に



使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～8、30～40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 (Pharmingen社)、Sf-900 II SFM培地 (Life Technologies社)、ExCell400、ExCell405 (いずれもJRH Biosciences社)、Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～7、25～30℃等の条件下で、1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ(MS)培地、ホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH 5～9、20～40℃の条件下で3～60日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、本発明の蛋白質をコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を製造することができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第二版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

本発明の蛋白質の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる蛋白質の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

本発明の蛋白質が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、または特開平5-336963、特開平6-823021等に記載の方法を準用することにより、該蛋白質を宿主細胞外に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明の蛋白質の活性部位を含む蛋白質の手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明の蛋白質を宿主細胞外に分泌させることができる。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

#### (4) リゾチーム感受性を有する細菌の作製

本発明の蛋白質が有する活性を不活性化させ、リゾチーム感受性を有する細菌を作製する方法について、以下に説明する。

本発明において、「本発明の蛋白質が有する活性を不活性化させる」とは、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の破壊、該遺伝子への転移因子の導入、該遺伝子へのアンチセンス遺伝子の導入等の方法を用いて、本発明の蛋白質が有する活性を低下または消失させることを意味する。

本発明の蛋白質をコードする遺伝子とは、遺伝子のプロモーター部分、オープンリーディングフレーム部分、ターミネーター部分等、本発明の蛋白質の有する活性の発現に関与する情報を有する塩基配列をいう。

本方法において用いられる細菌としては、例えばコリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、エシェリヒア属、セラチア属、

バチルス属またはシュードモナス属に属する微生物があげられるが、好ましくはコリネバクテリウム属、プレビバクテリウム属またはミクロバクテリウム属に属する微生物が、さらに好ましくはコリネバクテリウム属に属する微生物があげられる。

以下、一例としてコリネバクテリウムに属する微生物を用いたリゾチーム感受性を有する細菌の作製方法を記載する。

コリネバクテリウム属に属する微生物の染色体上の本発明の蛋白質をコードする遺伝子に置換、欠失、付加等の変異を導入し、本発明の蛋白質の有する活性を不活性化させることにより、リゾチーム感受性株を作製することができる。

染色体上の該遺伝子に置換、欠失、付加等の変異の導入する方法としては、以下の1) または2) に記載の方法を例示できる。

1) コリネバクテリウム属に属する微生物中で自立複製できないプラスミドに、本発明のDNAの一部または全部を挿入した組換え体プラスミドを作製する。作製した組換え体プラスミドを該微生物中に導入し、染色体上に存在する本発明の蛋白質をコードする遺伝子と該DNAとの配列の相同性を利用して、組換え体プラスミドを染色体上の相同領域に挿入する。または、該組換え体プラスミドに挿入されたDNAの一部または全部を染色体上の相同領域と置換する。

該微生物中で自立複製ができないプラスミドとしては、pSUP1021 (J. Bacteriol. 178, 5768 (1996))、pHSG298 (宝酒造社製) 等があげられる。

2) ある一定条件下において、該微生物中で自立複製できないプラスミドに、本発明のDNAの一部または全部を挿入することにより、組換え体プラスミドを作製する。作製した組換え体プラスミドを該微生物中に導入し、該組換え体プラスミドが自立複製できない条件下で、染色体上に存在する本発明の蛋白質をコードする遺伝子と該DNAとの配列の相同性を利用して、組換え体プラスミドを染色体上の相同領域に挿入する。または、該組換え体プラスミドに挿入されたDNAの一部または全部を染色体上の相同領域と置換する。

ある一定条件下において、該微生物中で自立複製できないプラスミドとしては、自立複製が温度感受性であるプラスミド pHSC4、pHSC22、pHSC23 (いずれ

も特開平 7-203977) 等があげられる。

上記いずれの方法においても、組換え体プラスミドを作製する前に、該プラスミドに挿入する本発明の DNA の一部または全部に、部位特異的変異誘発法により塩基の置換、欠失、付加等の変異を導入しておいてもよい。該プラスミドに薬剤耐性遺伝子、例えばカナマイシン耐性遺伝子等、選択マーカーとなる遺伝子を挿入しておけば、相同領域の置換した株を選択することが容易になる。

組換え体プラスミドの導入方法としては、上記宿主細胞へ DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、プロトプラスト法 (特開昭 57-186492、特開昭 58-56678、J. Bacteriol., 159, 306 (1984))、エレクトロポレーション法 (特開平 2-207791) 等をあげることができる。または、接合伝達によって、該プラスミドを大腸菌からコリネバクテリウム属に属する微生物に導入することもできる (J. Bacteriol. 172, 1663 (1990)、J. Bacteriol. 178, 5768 (1996))。

組換え体プラスミドに薬剤耐性遺伝子等、選択マーカーとなる遺伝子を挿入した場合は、該プラスミドを宿主細胞へ導入した後、薬剤耐性等を指標にして、相同置換した株を容易に選択することができる。

カナマイシンを選択マーカーとして用いる場合、相同置換した株を選択するための培地としては、 $1 \sim 800 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、好適には  $3 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$  のカナマイシンを含有する培地、例えば該濃度のカナマイシンを含有する LB 培地 [バクトトリプトン (ディフコ社製)  $10 \text{ g}/\text{l}$ 、酵母エキス (ディフコ社製)  $5 \text{ g}/\text{l}$ 、塩化ナトリウム  $5 \text{ g}/\text{l}$  (pH 7.2)] 等の培地を用いることができる。

カナマイシンを含有する培地で生育する菌株を選択することにより、相同置換した株を容易に選択することができる。

上記方法により選択した菌株を、通常の培地、例えば LB 培地 [バクトトリプトン (ディフコ社製)  $10 \text{ g}/\text{l}$ 、酵母エキス (ディフコ社製)  $5 \text{ g}/\text{l}$ 、塩化ナトリウム  $5 \text{ g}/\text{l}$  (pH 7.2)]、および該培地にリゾチームを含有する培地において、それぞれ  $20 \sim 39^\circ\text{C}$  で  $24 \sim 72$  時間培養する。

リゾチームを含有する培地としては、リゾチーム感受性微生物が感受性を示

す濃度のリゾチームを含有する培地が用いられ、例えば  $0.5 \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、好適には  $1 \sim 25 \mu\text{g}/\text{ml}$  のリゾチームを含有する培地が用いられる。

以上の方法により、リゾチーム感受性を有する細菌は、通常の培地では生育するが、リゾチームを含む培地では生育しない菌株として取得することができる。

#### (5) リゾチーム感受性を有する細菌を用いるアミノ酸の製造

リゾチーム感受性を有する細菌を用いるアミノ酸を製造する方法について、以下に説明する。

リゾチーム感受性を有する細菌は、酸性アミノ酸、中性アミノ酸、塩基性アミノ酸等いずれのアミノ酸の製造に用いてもよいが、グルタミン酸またはグルタミンの製造に好適に用いられる。

本方法は、リゾチーム感受性を有する細菌を用いる以外は、細菌、例えばコリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属またはミクロバクテリウム属に属する微生物を用いる、通常の発酵法によるアミノ酸の製造方法を用いることができる。

すなわち、該細菌を、炭素源、窒素源、無機物、アミノ酸、ビタミンなどを含有する合成または天然培地において、好氣的条件下、温度、pHなどを調節しながら培養し、培養物中にアミノ酸を生成蓄積させ、これを採取することにより、アミノ酸を製造することができる。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、マルトース、マンノース、グリセロール、澱粉、澱粉加水分解液、糖蜜などの炭水化物、ポリアルコール類、ピルビン酸、フマル酸、乳酸、酢酸などの有機酸等が用いられる。微生物の資化性によって、炭化水素、アルコール類なども用いられる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの無機および有機アンモニウム塩類、尿素、ペプトン、N Z -アミン、肉エキス、酵母エキス、コーン スチープ リカー、カゼイン加水分解物、フィッシュミ

ール、またはその消化物などの窒素含有有機物などが用いられる。

無機物としては、リン酸第一水素カリウム、リン酸第二水素カリウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガンおよび炭酸カルシウムなどが用いられる。

ビタミン、アミノ酸は、使用する培地の炭素源、窒素源などによって異なるが、必要に応じ、ビオチン、サイアミン、グルタミン酸などが用いられる。

培養は、通常振とう培養または通気攪はん培養などの好氣的条件下に行う。

培養は、通常 20 ～ 40℃、1 ～ 5 日間行う。

培養終了後、培養物から菌体を除去した後、得られた培養液を活性炭処理、イオン交換樹脂処理などの公知の方法を用いることにより、アミノ酸を採取することができる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、約 4 kb の挿入 DNA 断片について種々の欠失プラスミドを作製し、コリネバクテリウム・グルタミカム KY 9714 株のリゾチーム感受性の相補試験を行った結果を示した図である。p l a c は、ベクター p C 2 上に存在するラクトースプロモーターの位置を示す。+ はリゾチーム感受性を相補することを、- は相補しないことを示す。\* は染色体との相同組換えによる低頻度の相補が起こることを示す。約 4 kb の挿入 DNA 断片の概略の制限酵素地図およびオープンリーディングフレーム (ORF) の位置と方向を図中に示す。

図 2 は、遺伝子破壊株の、染色体構造の概略を示した図である。太線でベクター (p H S G 298) を、点線の矢印で ORF の位置と方向を示す。プライマーの種類と位置、PCR 産物の大きさと位置を図中に示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の実施例を示す。

## 実施例1 コリネバクテリウム・グルタミクムKY9611株の染色体DNAの調製

コリネバクテリウム・グルタミクムKY9611株を、10mlのL'培地（ポリペプトン 1%、イーストエキストラクト 0.5%、食塩 0.5%、グルコース 0.1%、チアミン  $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 、pH 7.2）に植菌し、30℃で一晩培養した。

培養後、得られた培養液より遠心分離により菌体を取得した。

該菌体をTE緩衝液〔50mM トリス塩酸、50mMエチレンジアミン四酢酸（EDTA）、pH 8.0〕を用いて洗浄後、800 $\mu\text{l}$ の同緩衝液に懸濁した。懸濁液に、50mg/mlのリゾチーム溶液を40 $\mu\text{l}$ 、10mg/mlのRNase A溶液を20 $\mu\text{l}$ 添加し、37℃で1時間反応させた。反応液に20%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）溶液を20 $\mu\text{l}$ 添加し、70℃で1時間反応させた。20mg/mlのプロテイナーゼ（Proteinase）K溶液を24 $\mu\text{l}$ 添加し、50℃で1時間反応させた。更にProteinase K溶液を24 $\mu\text{l}$ 添加し、50℃で1時間反応させた。得られた反応液に、等量のフェノールを加えて攪拌後、4℃で1晩放置し、DNAを水層に抽出し、水層を回収した。該水層に等量のフェノール/クロロフォルムを加えて攪拌後、2時間抽出し、水層を回収した。該水層に等量のクロロフォルム/イソアミルアルコールを加えて攪拌後、30分間抽出し、水層を回収した。該水層に2倍量のエタノールを添加し、DNAを沈殿させた。得られた沈殿物を300 $\mu\text{l}$ のTE緩衝液（10mM トリス塩酸、1mM EDTA、pH 8.0）に溶解し、染色体DNAとして用いた。

## 実施例2 リゾチーム感受性を回復する遺伝子の取得

実施例1で取得した染色体DNA 0.5 $\mu\text{g}$ とプラスミドpC2 0.5 $\mu\text{g}$ とをEcoRIで切断後、ライゲーションキット（宝酒造社製、TaKaRa DNA Ligation Kit ver.2）を用いて、16℃で16時間連結反応を行った。

該連結反応液を用いて、コリネバクテリウム・グルタミクムKY9714株をモレキュラー・クローニング第二版に記載の方法を用いて形質転換し、KY9714株の生育が温度感受性であるという性質を利用して形質転換体を選択

した。即ち、該形質転換体を  $5 \mu\text{l}/\text{ml}$  のカナマイシンを含む L' 寒天平板培地（L' 培地に 1.5% 寒天を加えたもの）に塗布し、 $37^\circ\text{C}$  で 3 日間培養した。

得られたコロニーはいずれも、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  リゾチームを含有する L' 寒天平板培地で良好な生育が認められ、リゾチーム非感受性であることが示された。生じたコロニーを実施例 1 に記載の方法に従って培養し、モレキュラー・クロニング第二版に記載の方法に従ってプラスミドを回収した。回収したプラスミド pHLS2 および pHLS4 について、その構造を解析したところ、いずれのプラスミドも、プラスミド pC2 の EcoRI 部位に、コリネバクテリウム・グルタミカム由来の約 4 kb の同一の DNA 断片が挿入した構造を有していた。pHLS2 および pHLS4 における挿入の方向はそれぞれ逆向きであった。

約 4 kb の挿入 DNA 断片の DNA 塩基配列を決定した。決定した EcoRI 断片 3825 bp の塩基配列を配列番号 5 に示した。このようにして決定した塩基配列には、配列番号 2 に示される 640 アミノ酸残基のアミノ酸配列をコードする、配列番号 1 に示される塩基配列からなる 1920 bp のオープンリーディングフレーム（ORF）が存在していた。なお、配列番号 1 に示される塩基配列は、配列番号 3 に示される塩基配列の 815～2734 番目の塩基配列に対応する。

配列番号 3 に示される塩基配列からなる DNA を含有するプラスミド pHLS4 を含むコリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) KY9714/pHLS4 は、FERM BP-6479 として、平成 10 年 9 月 1 日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号（郵便番号 305-8566）に寄託されている。

取得したプラスミドに挿入された約 4 kb の DNA 断片を用いて、常法に従い種々の欠失プラスミドを作製し、コリネバクテリウム・グルタミカム KY9714 株のリゾチーム感受性の相補試験を行ったところ、リゾチーム感受性の相補には、上記で見出された 640 アミノ酸残基からなる 1920 bp の ORF が必須であることが判明した（図 1）。



また、約4 kbの挿入DNA断片のうち、約1 kbのE c o R I - S a c I 切断断片を欠くp H L S 2 Sおよび約1.4 kbのE c o R I - K p n I 切断断片を欠くp H L S 4 Kを用いた相補試験の結果、染色体DNAとの相同組換えによると推定される、低頻度のリゾチーム感受性の相補が観察された(図1)。

このことは、1920 bpのORFのうち、約1.2 kbのS a c I - K p n I 断片、すなわち配列番号1に示される塩基配列のうち271~1593番目までの配列の中に、コリネバクテリウム・グルタミクムK Y 9 7 1 4株のリゾチーム感受性の原因となる変異が存在することを示している。

### 実施例3 リゾチーム感受性株の変異点の同定

実施例1と同様の方法により、コリネバクテリウム・グルタミクムK Y 9 7 1 4株の染色体DNAを調製した。実施例2の、約1.2 kbのS a c I - K p n I 断片中に、コリネバクテリウム・グルタミクムK Y 9 7 1 4株のリゾチーム感受性の原因となる変異が存在するとの知見に基づいて、1920 bpのORFのN末70~77アミノ酸領域に対応する配列番号6記載のDNAおよび同じくN末335~342アミノ酸領域に対応する配列番号5記載のDNAをプライマーとして用いて、K Y 9 7 1 4株の染色体DNAを鋳型としてPCRを行った。

PCRは、TaKaRa LA PCR Kit Ver.2.2を用いて、94℃で1分間、98℃で20秒間、50℃で30秒間、62℃で3分間からなる反応行程を1サイクルとして、29サイクル行った後、70℃で10分間反応させる条件で行った。

該反応液をアガロースゲル電気泳動にかけた後、PCR反応の結果生じた約0.8 kbのDNA断片をモレキュラー・クローニング第二版に記載の方法に従って抽出し、DNA断片を回収した。DNA断片をS a l IおよびS p h Iで切断後、S a l IおよびS p h Iで切断したプラスミドp H S G 3 9 8(宝酒造社製)と混合し、ライゲーションキット(TaKaRa DNA Ligation Kit ver.2、宝酒造社製)を用いて、16℃で16時間連結反応を行った。該反応液を用いてエシェリヒア・コリ(*E. coli*) J M 1 0 9株(ストラタジーン社製)をモレキュラー・クローニング第二版に記載の方法に従って形質転換した。

得られた形質転換体よりプラスミドを抽出し、プラスミド中に挿入された約

0.8 kbのSalI-SphIのDNA断片の塩基配列を決定した。実施例2でKY9611株より取得したDNAの対応する領域との比較を行った結果、KY9714株では、640アミノ酸残基からなる蛋白質（配列番号2）をコードする1920bpのORF（配列番号1）中132番目のトリプトファンをコードするコドンが、TGGからTAGに変異していることが判明した。

#### 実施例4 リゾチーム感受性の相補

実施例2で得られたプラスミドpHLS2を、コリネバクテリウム・グルタミクムKY9611より誘導されたリゾチーム感受性株ATCC31834株、KY11939株、KY11940株、KY11941株、およびコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032株より誘導されたリゾチーム感受性株KY9704株、KY9706株等、各種のリゾチーム感受性株にそれぞれ導入して、リゾチーム感受性の変化を検討した。

その結果、上記のリゾチーム感受性株は、いずれもリゾチームを12.5  $\mu$ g/ml含有するL'寒天平板培地でその生育が認められなかった。一方、これら菌株にpHLS2を導入して得られた形質転換体は、リゾチームを100  $\mu$ g/ml含有するL'寒天平板培地においても良好な生育が認められた。

上記の結果は、いずれの変異株においても上記で見出された640アミノ酸残基からなる1920bpのORFによってリゾチーム感受性が相補されること、および該ORFの変異がリゾチーム感受性の原因であることを示している。

#### 実施例5 リゾチーム感受性株によるグルタミン酸およびグルタミンの生産

コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032株より誘導されたリゾチーム感受性株KY9704株およびKY9706株を用いて、ビオチンを過剰に含有する培地でのグルタミン酸およびグルタミンの生産について検討した。

KY9704株およびKY9706株を、それぞれ10mlのL'培地に30℃で24時間培養して得られた種培養液0.5mlを、グルコース 50g/l、 $(\text{NH})_2\text{SO}_4$  3g/l、尿素 3g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g/l、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10mg/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  10mg/l、ビオチン 100

$\mu\text{g}/\text{l}$ 、チアミン塩酸塩  $500\mu\text{g}/\text{l}$ 、フェノールレッド  $10\text{mg}/\text{l}$  (pH 7.0) の組成を有する培地  $10\text{ml}$  に植菌し、 $30^\circ\text{C}$  で 48 時間培養した。

培養後、培地中のグルタミン酸およびグルタミンの生成量を測定した。その結果、KY9704 株では、 $4.5\text{g}/\text{l}$  のグルタミン酸の蓄積が、KY9706 株では  $9.0\text{g}/\text{l}$  のグルタミンの蓄積が、それぞれ認められた。

同じ条件で親株である ATCC 13032 株、ならびに KY9704 株および KY9706 株にそれぞれ pHLS2 を導入して得られた形質転換体を用い、上記と同様に培養し、グルタミン酸およびグルタミンの生成量を測定した。しかし、いずれの形質転換体においても、グルタミン酸およびグルタミンの蓄積が認められなかった。

上記の結果は、上記の 640 アミノ酸残基からなる 1920 bp の ORF において変異を起こすことにより、ビオチンを過剰に含有する培地においてグルタミン酸およびグルタミンを生産することが可能であることを示している。

#### 実施例 6 コリネバクテリウム・グルタミクムの遺伝子破壊株の作製

実施例 2 で取得した DNA 断片を *SalI* および *PstI* で切断し、約 1.2 kb の *SalI* - *PstI* 断片をモレキュラー・クローニング第二版に記載の方法に従って取得した。回収した DNA と *SalI* および *PstI* で切断したプラスミド pHSG298 (宝酒造社製) とを混合し、ライゲーションキット (宝酒造社製、TaKaRa DNA Ligation Kit ver.2) を用いて、 $16^\circ\text{C}$  で 16 時間連結反応を行った。該反応液を用いモレキュラー・クローニング第二版に記載の方法に従ってコリネバクテリウム・グルタミクム KY9611 株を形質転換した。

該形質転換体を、カナマイシンを  $10\mu\text{l}/\text{ml}$  含む L' 寒天平板培地に塗布し、 $30^\circ\text{C}$  で 2 日間培養した。

培養後、生じたコロニーより、実施例 1 に記載の方法に従って染色体 DNA を取得した。取得した染色体 DNA を鋳型として、プラスミド pHSG298 に対応する配列番号 6 で示される塩基配列を有する M13 Primer RV (宝酒造社製)、および、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質の N 末端から 70

～ 77 番目のアミノ酸残基に対応する、配列番号 4 記載の DNA をプライマーとして、実施例 3 記載の方法に従って PCR 反応を行った。その結果、いずれの形質転換体からも約 1.65 kb の断片が得られた。

上記の結果は、pHSG298 が、約 1.2 kb の Sal I - Pst I の領域との相同性により、染色体上の 1920 bp の ORF に組み込まれ、該 ORF が破壊されたことを示している（図 2）。

こうして取得した遺伝子破壊株はいずれも、12.5  $\mu$ g/ml のリゾチームを含有する L' 寒天平板培地でその生育は観察されなかった。

上記の結果は、染色体上の 1920 bp の ORF を破壊することで、効率的にリゾチーム感受性微生物を取得できることを示している。

#### 産業上の利用可能性

本発明によれば、コリネバクテリウム・グルタミクムに属するリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質、該蛋白質をコードする DNA、該 DNA を含有する組換えベクター、該組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体、該蛋白質が有する活性を不活性化させたリゾチーム感受性を有する細菌、および該細菌を用いるアミノ酸の製造方法を提供することができる。

#### 「配列リストフリーテキスト」

配列番号 4 - 人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 5 - 人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 6 - 人工配列の説明：合成 DNA

## 請求の範囲

1. 配列番号2で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質、または配列番号2で示されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつコリネバクテリウム・グルタミクムに属するリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質をコードするDNA。
2. 配列番号2で示されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつコリネバクテリウム・グルタミクムに属するリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質をコードするDNA。
3. 配列番号1で示される塩基配列からなるDNA、または配列番号1に示されるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつコリネバクテリウム・グルタミクムに属するリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質をコードするDNA。
4. FERM BP-6479に含有されるプラスミドに含まれ、かつコリネバクテリウム・グルタミクムに属するリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質をコードするDNA。
5. コリネバクテリウム・グルタミクムに属するリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質が、コリネバクテリウム・グルタミクムに属し、かつ $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下のリゾチームに感受性を有する変異株に $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のリゾチームに非感受性を付与する活性を有する蛋白質である、請求の範囲1～4のいずれかに記載のDNA。
6. DNAがコリネバクテリウム属に属する微生物由来のDNAである請求の範囲1～5のいずれかに記載のDNA。
7. DNAがコリネバクテリウム・グルタミクムに属する微生物由来のDNAである請求の範囲1～5のいずれかに記載のDNA。
8. 請求の範囲1～7のいずれかに記載のDNAを含有してなる組換えベクター。

9. 請求の範囲 8 記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

10. 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質、または配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつコリネバクテリウム・グルタミクムのリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質。

11. 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と 60% 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつコリネバクテリウム・グルタミクムのリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質。

12. コリネバクテリウム・グルタミクムに属するリゾチーム感受性微生物にリゾチーム非感受性を付与する活性を有する蛋白質が、コリネバクテリウム・グルタミクムに属し、かつ  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  以下のリゾチームに感受性を有する変異株に  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  のリゾチームに非感受性を付与する活性を有する蛋白質である、請求の範囲 10 または 11 に記載の蛋白質。

13. 請求の範囲 10 記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求の範囲 10 ~ 12 のいずれかに記載の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする蛋白質の製造方法。

14. 請求の範囲 10 ~ 12 のいずれかに記載の蛋白質が有する活性を不活性化させることを特徴とする、リゾチーム感受性を有する細菌の作製方法。

15. 染色体上に存在する請求の範囲 10 ~ 12 のいずれかに記載の蛋白質をコードする遺伝子に変異を導入する、請求の範囲 14 記載の方法。

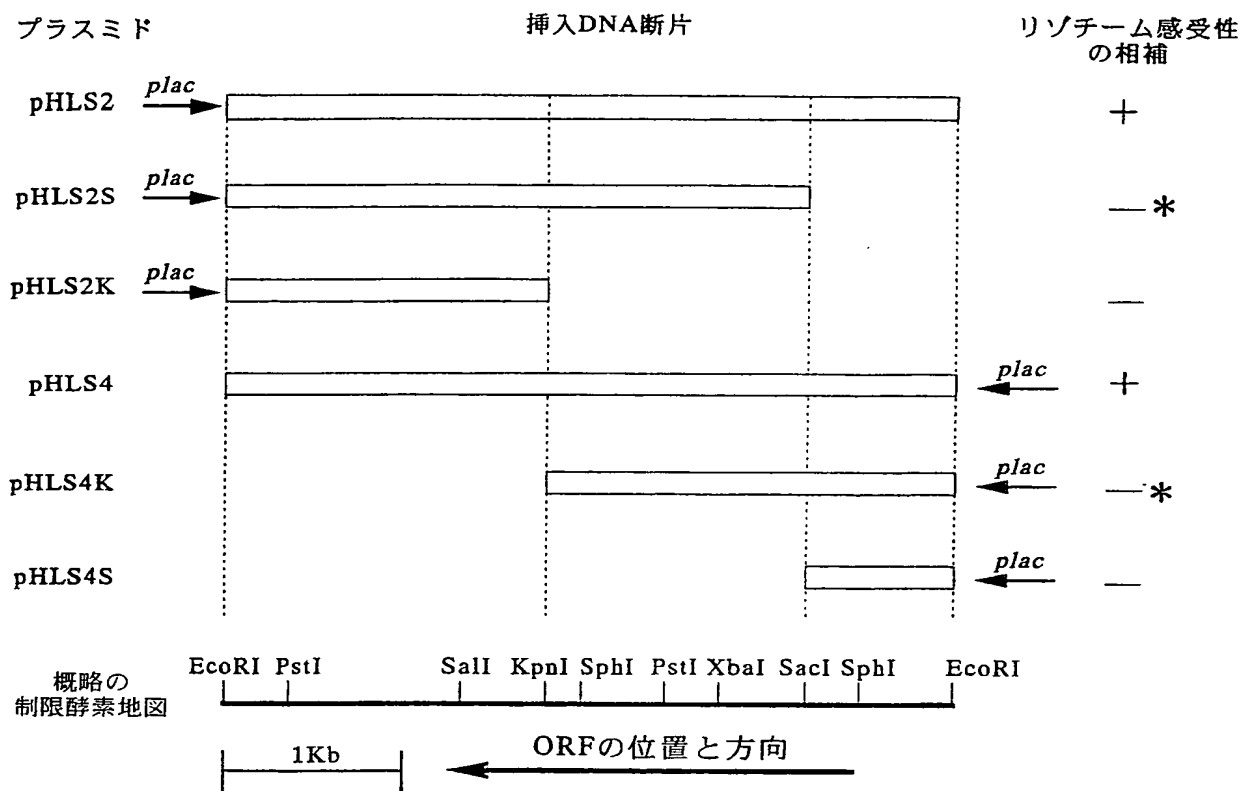
16. 細菌がコリネバクテリウム属に属する微生物である、請求の範囲 14 または 15 記載の方法。

17. 請求の範囲 14 ~ 16 のいずれかに記載の方法により得られる細菌。

18. 請求の範囲 17 記載の細菌を培地に培養し、培養物中にアミノ酸を生成蓄積させ、該培養物からアミノ酸を採取することを特徴とするアミノ酸の製造方法。

19. アミノ酸がグルタミン酸またはグルタミンである請求の範囲 18 記載の方法。

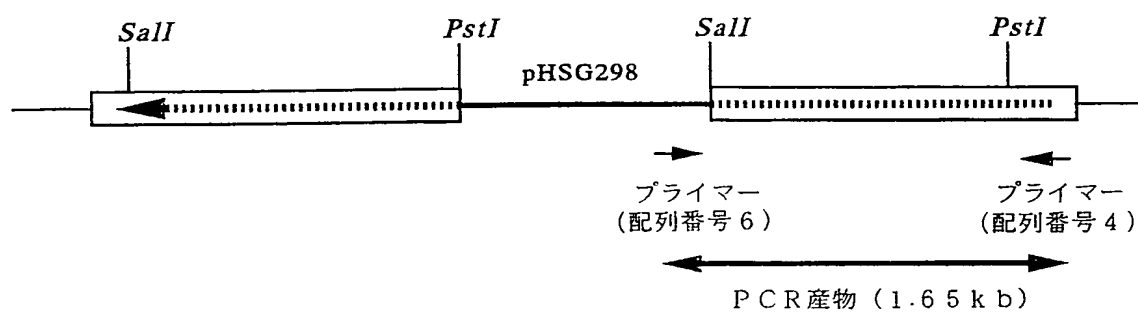
图 1



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



図 2



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

「配列リスト部分」

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

&lt;120&gt; Novel Gene

&lt;130&gt; 1101

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1920

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;400&gt; 1

atgtgcggcc ttcttggcat attgactgca aatgggaacg ctgaagcatt cgttcctgca 60

ctcgagcggg ccttgccatg catgcgccac cgtggctctg acgatgccgg cacttggcat 120

gacgccgatg cagcgtttgg attcaaccgc ctctccatca ttgatattgc aactccac 180

caaccactgc gttggggacc tgcggatgaa cccgaccgct acgcaatgac ttcaacggt 240

gagatctaca actacgttga gctgcgtaaa gagctctcgg atttgggata tacctttaat 300

acttctggcg atggcgagcc aattgttgtc ggtttccacc actggggcga gtccgtggtc 360

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

gagcatctcc gcggaatgtt cggcattgcc atttgggata caaaggaaaa gtcgcttttc 420  
cttgcgcgtg atcagttcgg catcaagcca ctgttctacg caaccaccga gcatggcacc 480  
gtgttctcct cagagaagaa gaccatcttg gagatggccg aggagatgaa tctagatctg 540  
ggccttgata agcgcaccat tgagcactac gtggacctgc agtacgtgcc cgagccagat 600  
acccttcacg cgcagatttc ccgcttggag tcaggctgca ccgcaacagt tcgtccgggc 660  
ggcaagctgg aacagaagcg ttacttcaag cctcagttcc cagtacagaa ggtcgtaaag 720  
ggtaaggagc aggacctctt cgatcgcatt gcccaggtgt tggaggatag cgtcgaaaag 780  
catatgcgtg ccgacgtgac cgtaggctcg ttcctttccg gcggcattga ctcaaccgca 840  
attgcgccgc ttgcaaagcg ccacaaccct gacctgctca ccttcaccac cggtttcgag 900  
cgtgaaggct actcggaggt cgatgtggct gcggagtccg ccgctgcgat tggcgctgag 960  
cacatcgtga agattgtctc gcctgaggaa tacgccaacg cgattcctaa gatcatgtgg 1020  
tacttgatg atcctgtagc tgacctatca ttgggtcccgc tgtacttcgt ggcagcggaa 1080  
gcacgtaagc acgtcaaggt tgtgctgtct ggcgaggcg cagatgagct gttcggtgga 1140  
tacaccattt acaaagagcc gctatcgctt gctccatttg agaagatccc ttccccacta 1200

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

cgtaaaggcc tgggaaagct cagcaaggtt ctgccagacg gcatgaaggg caagtcctt 1260  
cttgagcgtg gtcctatgac catggaagag cgctactacg gcaacgctcg ctccttcaat 1320  
ttcgagcaga tgcaacgcgt tattccatgg gcaaagcgcg aatgggacca ccgcgaagtc 1380  
actgcaccga tctacgcaca atcccgcaac tttgatccag tagcccgcat gcaacacctg 1440  
gatctgttca cctggatgcg cggcgacatc ctggtcaagg ctgacaagat caacatggcg 1500  
aactcccttg agctgcgagt tccattcttg gataaggaag ttttcaaggt tgcagagacc 1560  
attccttacg atctgaagat tgccaacggt accaccaagt acgcgctgcg cagggcactc 1620  
gagcagattg ttccgcctca cgttttgac cgcaagaagc tgggcttccc tgttcccatg 1680  
cgccactggc ttgccggcga tgagctgttc ggttgggcgc aggacaccat taaggaatcc 1740  
ggtactgaag atatcttcaa caagcaggct gtgctggata tgctgaacga gcaccgcgat 1800  
ggcgtgtcag atcattcccg tcgactgtgg actgttctgt catttatggt gtggcacggc 1860  
atttttgtgg aaaaccgcat tgatccacag attgaggacc gctcctaccc ggtcgagctt 1920

<210> 2

<211> 640

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



&lt;400&gt; 2

Met Cys Gly Leu Leu Gly Ile Leu Thr Ala Asn Gly Asn Ala Glu Ala

1

5

10

15

Phe Val Pro Ala Leu Glu Arg Ala Leu Pro Cys Met Arg His Arg Gly

20

25

30

Pro Asp Asp Ala Gly Thr Trp His Asp Ala Asp Ala Ala Phe Gly Phe

35

40

45

Asn Arg Leu Ser Ile Ile Asp Ile Ala His Ser His Gln Pro Leu Arg

50

55

60

Trp Gly Pro Ala Asp Glu Pro Asp Arg Tyr Ala Met Thr Phe Asn Gly

65

70

75

80

Glu Ile Tyr Asn Tyr Val Glu Leu Arg Lys Glu Leu Ser Asp Leu Gly

85

90

95

Tyr Thr Phe Asn Thr Ser Gly Asp Gly Glu Pro Ile Val Val Gly Phe

100

105

110

His His Trp Gly Glu Ser Val Val Glu His Leu Arg Gly Met Phe Gly

115

120

125

Ile Ala Ile Trp Asp Thr Lys Glu Lys Ser Leu Phe Leu Ala Arg Asp

130

135

140

Gln Phe Gly Ile Lys Pro Leu Phe Tyr Ala Thr Thr Glu His Gly Thr

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

145	150	155	160
Val Phe Ser Ser Glu Lys Lys Thr Ile Leu Glu Met Ala Glu Glu Met			
	165	170	175
Asn Leu Asp Leu Gly Leu Asp Lys Arg Thr Ile Glu His Tyr Val Asp			
	180	185	190
Leu Gln Tyr Val Pro Glu Pro Asp Thr Leu His Ala Gln Ile Ser Arg			
	195	200	205
Leu Glu Ser Gly Cys Thr Ala Thr Val Arg Pro Gly Gly Lys Leu Glu			
	210	215	220
Gln Lys Arg Tyr Phe Lys Pro Gln Phe Pro Val Gln Lys Val Val Lys			
	225	230	235
			240
Gly Lys Glu Gln Asp Leu Phe Asp Arg Ile Ala Gln Val Leu Glu Asp			
	245	250	255
Ser Val Glu Lys His Met Arg Ala Asp Val Thr Val Gly Ser Phe Leu			
	260	265	270
Ser Gly Gly Ile Asp Ser Thr Ala Ile Ala Pro Leu Ala Lys Arg His			
	275	280	285
Asn Pro Asp Leu Leu Thr Phe Thr Thr Gly Phe Glu Arg Glu Gly Tyr			
	290	295	300

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Ser Glu Val Asp Val Ala Ala Glu Ser Ala Ala Ala Ile Gly Ala Glu  
305 310 315 320

His Ile Val Lys Ile Val Ser Pro Glu Glu Tyr Ala Asn Ala Ile Pro  
325 330 335

Lys Ile Met Trp Tyr Leu Asp Asp Pro Val Ala Asp Pro Ser Leu Val  
340 345 350

Pro Leu Tyr Phe Val Ala Ala Glu Ala Arg Lys His Val Lys Val Val  
355 360 365

Leu Ser Gly Glu Gly Ala Asp Glu Leu Phe Gly Gly Tyr Thr Ile Tyr  
370 375 380

Lys Glu Pro Leu Ser Leu Ala Pro Phe Glu Lys Ile Pro Ser Pro Leu  
385 390 395 400

Arg Lys Gly Leu Gly Lys Leu Ser Lys Val Leu Pro Asp Gly Met Lys  
405 410 415

Gly Lys Ser Leu Leu Glu Arg Gly Ser Met Thr Met Glu Glu Arg Tyr  
420 425 430

Tyr Gly Asn Ala Arg Ser Phe Asn Phe Glu Gln Met Gln Arg Val Ile  
435 440 445

Pro Trp Ala Lys Arg Glu Trp Asp His Arg Glu Val Thr Ala Pro Ile  
450 455 460

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Tyr Ala Gln Ser Arg Asn Phe Asp Pro Val Ala Arg Met Gln His Leu  
465 470 475 480

Asp Leu Phe Thr Trp Met Arg Gly Asp Ile Leu Val Lys Ala Asp Lys  
485 490 495

Ile Asn Met Ala Asn Ser Leu Glu Leu Arg Val Pro Phe Leu Asp Lys  
500 505 510

Glu Val Phe Lys Val Ala Glu Thr Ile Pro Tyr Asp Leu Lys Ile Ala  
515 520 525

Asn Gly Thr Thr Lys Tyr Ala Leu Arg Arg Ala Leu Glu Gln Ile Val  
530 535 540

Pro Pro His Val Leu His Arg Lys Lys Leu Gly Phe Pro Val Pro Met  
545 550 555 560

Arg His Trp Leu Ala Gly Asp Glu Leu Phe Gly Trp Ala Gln Asp Thr  
565 570 575

Ile Lys Glu Ser Gly Thr Glu Asp Ile Phe Asn Lys Gln Ala Val Leu  
580 585 590

Asp Met Leu Asn Glu His Arg Asp Gly Val Ser Asp His Ser Arg Arg  
595 600 605

Leu Trp Thr Val Leu Ser Phe Met Val Trp His Gly Ile Phe Val Glu

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



610

615

620

Asn Arg Ile Asp Pro Gln Ile Glu Asp Arg Ser Tyr Pro Val Glu Leu

625

630

635

640

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 3825

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;400&gt; 3

gaattcaccc tcgccacgct tticagccct ctttgcgcc caggcaaaga tggcggtgag 60

gaatagaccc cacatgatga tgccgatgat ccaggcagca acccagaccc atgaccagaa 120

gttaccatg gccactgctt caggggtaat gccatcaggc caaccatac gtaggaaatc 180

tccaagcaca ccgccagagg ggcgacttca cagcctgcga tggcgaggcc acctaagctc 240

aagacaccgc caagcagggc cttgcgcttt aaaccacgct tatTTtgctg ttctacgtgt 300

gttctgcctt cctgtccaca caaaaaccag agaccttacg gtcatttcta tcttcgcaga 360

atagcctatt tgccagccga ttccatatct tgtgtttggt ggaaatatct tcgtgggttt 420

cgTTTTtagg ggcgtcaaat gtctttcaac tgcaacgata tgcccgaatc ctcaggtgga 480

atacctaaag tctaggcaat tgggtgatgc cagtcacag accatcaacc ttttgattgc 540

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

ccttgaaatt cccccaccct taccacctac gttcctacaa ggtgcatgta ttaggaaatc 600  
aatctggttt tcaggaacct ttgaggatgc tgcaatagtc agctgatgca cgttgttga 660  
gggagctttc gtcaattttg gcgtgccctt ttcacctcag atgtaacttc gccgtatcgt 720  
tgacacgaga ttttaacaaat gcagcgtctt atttcttcca acaaaatttc tttgcgattt 780  
aaggcgcctt ttatttcagg aggatttttc attcatgtgc ggccttcttg gcatattgac 840  
tgcaaatggg aacgctgaag cattcggttc tgcaactgag cgggccttgc catgcatgcg 900  
ccaccgtggt cctgacgatg ccggcacttg gcatgacgcc gatgcagcgt ttggattcaa 960  
ccgcctctcc atcattgata ttgcacactc ccaccaacca ctgcgttggg gacctgcgga 1020  
tgaacccgac cgctacgcaa tgactttcaa cggtgagatc tacaactacg ttgagctgcg 1080  
taaagagctc tcggatttgg gatatacctt taatacttct ggcgatggcg agccaattgt 1140  
tgtcggtttc caccactggg gcgagtcctt ggtcgagcat ctccgcggaa tgttcggcat 1200  
tgccatttgg gatacaaagg aaaagtcgct tttccttgcg cgtgatcagt tcggcatcaa 1260  
gccactgttc tacgcaacca ccgagcatgg caccgtgttc tcctcagaga agaagaccat 1320  
cttgagatg gccgaggaga tgaatctaga tctgggcctt gataagcgca ccattgagca 1380  
ctacgtggac ctgcagtacg tgcccagacc agataccctt cacgcgcaga tttcccgctt 1440

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

ggagtcaggc tgcaccgcaa cagttcgtcc gggcggcaag ctggaacaga agcgttactt 1500  
caagcctcag ttcccagtac agaaggctcgt aaagggttaag gagcaggacc tcttcgatcg 1560  
cattgcccag gtgttggagg atagcgtcga aaagcatatg cgtgccgacg tgaccgtagg 1620  
ctcgttcctt tccggcggca ttgactcaac cgcaattgcg ccgcttgcaa agcgccacaa 1680  
ccctgacctg ctcaccttca ccaccggttt cgagcgtgaa ggctactcgg aggtcgatgt 1740  
ggctgcggag tccgccgctg cgattggcgc tgagcacatc gtgaagattg tctgcctga 1800  
ggaatacgcc aacgcgattc ctaagatcat gtggtacttg gatgatcctg tagctgacct 1860  
atcattggtc ccgctgtact tcgtggcagc ggaagcacgt aagcacgtca aggttgtgt 1920  
gtctggcgag ggcgcagatg agctgttcgg tggatacacc atttacaag agccgctatc 1980  
gcttgctcca tttgagaaga tcccttcccc actacgtaaa ggcctgggaa agctcagcaa 2040  
ggttctgcca gacggcatga agggcaagtc ccttcttgag cgtggctcca tgaccatgga 2100  
agagcgctac tacggcaacg ctcgctcctt caatttcgag cagatgcaac gcgttattcc 2160  
atgggcaaag cgcgaatggg accaccgca agtcactgca ccgatctacg cacaatcccc 2220  
caactttgat ccagtagccc gcatgcaaca cctggatctg ttcacctgga tgcgcggcga 2280

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

catcctggtc aaggctgaca agatcaacat ggcgaaactcc cttgagctgc gagttccatt 2340  
cttggataag gaagttttca aggttgcaga gaccattcct tacgatctga agattgccaa 2400  
cggtaccacc aagtacgcgc tgcgcagggc actcgagcag attgttccgc ctcacgtttt 2460  
gcaccgcaag aagctgggct tccctgttcc catgcgccac tggcttgccg gcgatgagct 2520  
gttcggttgg gcgcaggaca ccattaagga atccggtact gaagatatct tcaacaagca 2580  
ggctgtgctg gatatgctga acgagcaccg cgatggcgtg tcagatcatt cccgtcgact 2640  
gtggactggt ctgtcattta tgggtgtggca cggcattttt gtggaaaacc gcattgatcc 2700  
acagattgag gaccgctcct acccggtcga gctttaagtc ttaaagccta aacccccctcc 2760  
ttctcaagga ggggggtttca ctatttcctg aggacaaagc aattacgcca gcaaacacaa 2820  
aagctcggcc gtagacaatg cgtccagggc cgagccttta ttcctatata acggaatctc 2880  
tttagttgaa ggagtcacca caagcgcaag agctgcctgc gtttgggttg tcgatgggtga 2940  
agccctgctg ctcgatgggtg tcagcgaagt cgatctgagc gccgagcagg tatgggggtgc 3000  
tcatcttgct aacgacaagg cgaacgccac cgacgatgtc ttccttatcg ccatcaaggg 3060  
tgcggtcgtc gaagtaaagc tggtaacgaa ggccagagca gccgccaggc tgaacggcga 3120  
tacgcagaga gaggtcgtcg cggccttcct gatcgatgag tgccttagct ttggacgctg 3180

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



cggactcgggt caagataaca ccggtgttgg ttgatggagc ggtcatcgct ttagtctcct 3240  
taactgttgg ccctttgaat tacttttagg ccgggacatc ataggcttgc agtgtactcc 3300  
cctttttacg gatctccggc gagcgatgct ggattacgtt catatgggaa gcggatggat 3360  
gttccccagc ctactcaccg tccacagatg agtaaaccgc gaaaaaccgc tatttagtta 3420  
ttggttttac ctgcgtgggc tgaaagtctt cacttttaat cttacagat ggtcgttctg 3480  
attcctttca acgatgaagt gtgcaccctt attcccgatt tgggaggttt tccttgtagc 3540  
ctattgagtg tgaaacttcc ttgggataaa aataagaaca acgaaggggc tgacgctgca 3600  
ggccaagacg ccagctccac ccctgagacc gctacgcctg acgctactga gcagaaattg 3660  
ccaaaggggc acacggcacc gaagggccgt cccactccga agcgtcgtga agttgagtta 3720  
gagcgaggtg tcgttggcgg ccagtctttg ggcctactg atacttatgc gcagcagcgc 3780  
cagaagcgta aagaatttaa agcatctatg accaaggaag aattc 3825

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4

tgaacccgac cgcatgccaa tgact

25

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5

tccaaggtcg acatgatctt aggaa

25

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 6

caggaaacag ctatgac

17

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

出願人又は代理人の書類記号 1101	国際出願番号 PCT/JP98/03981
-----------------------	--------------------------

**寄託された微生物に関する表示**  
(PCT規則13の2)

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

22 頁、 22 行

B. 寄託の表示

他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）

寄託の日付

01.09.98

受託番号

FERM BP-6479

C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない）

この情報は別紙に続いている ☐

ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である（Rule 28 (4) EPC）。

D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

E. 追加事項の表示の提出（該当しない場合には記載しない）

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）

— 受理官庁記入欄 —

☒ この用紙は国際出願とともに受理した

権限のある職員

山口 義雄

様式PCT/RO/134 (1992年7月)

— 国際事務局記入欄 —

☒ この用紙が国際事務局に受理された日

21 SEP 1998

権限のある職員

武田 一三

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(23) Statement concerning non-perjudicial disclosure or exception to lack of novelty.

[不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する陳述]

開示の日： 1998年4月1日 (講演要旨集発行日：1998年3月5日)

開示の場所： 名城大学 Meijo University

開示の種類： 学会発表 Oral Presentation

博覧会、学会又は会議の名称： 日本農芸化学会1998年度大会 Annual Meeting of  
Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 1998



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP98/03981

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/31, C12P21/02, C12N1/21 // (C12N15/31, C12R1:15),  
(C12N1/21, C12R1:15)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/31, C12P21/02, C12N1/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG),  
BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 62-49038, B2 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 16 October, 1987 (16. 10. 87) (Family: none)	1-19
A	JP, 1-29555, B2 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 12 June, 1989 (12. 06. 89) (Family: none)	1-19
A	JP, 58-56678, A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 4 April, 1983 (04. 04. 83) & EP, 64680, B & CA, 1185197, A & US, 4681847, A	1-19
A	JP, 54-122794, A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 22 September, 1979 (22. 09. 79) (Family: none)	1-19
A	JP, 62-44171, A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 26 February, 1987 (26. 02. 87) (Family: none)	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
19 November, 1998 (19. 11. 98)

Date of mailing of the international search report  
1 December, 1998 (01. 12. 98)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/03981

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/31, C12P 21/02, C12N 1/21/(C12N 15/31, C12R 1:15),  
(C12N 1/21, C12R 1:15)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/31, C12P 21/02, C12N 1/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 62-49038, B2 (協和醗酵工業株式会社) 16. 10月. 1987 (16.10.87) パテントファミリーなし	1-19
A	JP, 1-29555, B2 (協和醗酵工業株式会社) 12. 6月. 1989 (12.06.89) パテントファミリーなし	1-19
A	JP, 58-56678, A (協和醗酵工業株式会社) 4. 4月. 1983 (04.04.83) & EP, 64680, B & CA, 1185197, A & US, 4681847, A	1-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 11. 98

国際調査報告の発送日

01.12.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 54-122794, A (協和醗酵工業株式会社) 22. 9月. 1979 (22. 09. 79) パテントファミリーなし	1 - 19
A	JP, 62-44171, A (協和醗酵工業株式会社) 26. 2月. 1987 (26. 02. 87) パテントファミリーなし	1 - 19